

⑪ 日本国特許庁(JP)

⑫ 特許出願公開

⑬ 公開特許公報(A)

平1-157395

⑭ Int. Cl. 4	識別記号	庁内整理番号	⑮ 公開 平成1年(1989)6月20日
C 12 P 1/00		Z-6807-4B	
C 12 N 1/14		C-7235-4B	
		A-8515-4B	
C 12 P 1/04		Z-6807-4B	
		Z-6807-4B	
//(C 12 N 1/14			
C 12 R 1:645)			
(C 12 N 1/20			
C 12 R 1:01)			
(C 12 P 1/04			
C 12 R 1:01)			

審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

⑯ 発明の名称 微生物の培養法

⑰ 特 願 昭62-313444

⑱ 出 願 昭62(1987)12月11日

⑲ 発 明 者 石 崎 文 彬 福岡県福岡市西区姪浜1-10-1-611  
⑳ 出 願 人 サントール株式会社 福岡県福岡市中央区天神2丁目8番221号  
㉑ 代 理 人 弁理士 松尾 憲一郎

明細書の浄書

明 細 書

1. 発明の名称

微生物の培養法

2. 特許請求の範囲

1) 天然ゴムの樹液からラテックスを分離した残りの母液を濃縮し、もしくはスプレードライ法によって粉末化して、それをそのまま発酵培地とし、または発酵培地に一部添加して、その培地に細菌(放線菌を含む)、真菌(酵母または糸状菌)を接種して増殖させ、菌体を生産させ、かつ/また特定の発酵生産物を蓄積させる微生物の培養法。

3. 発明の詳細な説明

天然ゴムの樹液からラテックスを分離した残りの母液(以下 Natural Rubber Serum 略して NRS と呼ぶ)は、いわば天然ゴム生産における産業廃棄物であり、天然ゴム生産場におけるこの放置は環境保全上看過できなくなりつつある。まし

て、NRS は、多量のタンパク質を含み、有機酸、糖類、及びその誘導体をふくんでいるので、微生物にとっては富栄養価をもつものと考えられ、放置すれば、大きな環境汚染を引き起こすことになりかねないが、反面、資源化できれば新しい大きなバイオマスとなりうる可能性もひめている。

本発明者は、東南アジアのラテックス工場で排出する NRS を原料としてこれを濃縮し、あるいは粉末の NRS としたものを用いて実験し、このような液状あるいは粉末の NRS には色々な微生物に対する生育促進効果や、生育必須因子を含んでいることを見いだした。

一般に、微生物はその生育に色々な栄養因子を要求することが多く、それらは、アミノ酸、ビタミン、ミネラルなど多様であり、また、必ずしも人だけでなく、複数の栄養因子を要求することも多い。従って、発酵用の培地には、複数の栄養因子を供給する目的で、有機窒素源などの天然の有機栄養が用いられる。これらには、脱脂大豆加水分解液(HVP)、Corn Steep Liquor(CSL)、綿実ミ

ール、ビーナッツミール、pharmamedia、distillers soluble、家畜血液、屠殺廃液、カゼイン水解物など多種多様である。しかも、これらを工業生産の発酵原料とする場合には、コストが安価なこと、季節的、突発的ではなく安定的に供給できること、品質が安定していることなどが必須である上に、色々な微生物に広く効果のある、普遍的なものであることが望ましい。このような条件を満足するのは、上記の多数の天然有機栄養源のなかでも、HVP、CSL、酵母エキスなどに限られるが、HVPやCSLはそれぞれ食品工業の副産物として製造されている為に、最近では製法の転換とともにコスト高になったり、供給量が減少しており、酵母エキスはコスト高で工業原料としては難点が多い。

粉末NRSの一般的性状は、元素分析値では

C	22 %
H	5.5 %
N	9.5 %
Ash	18.5 %

このような実験事実を考えると、NRSの微生物に対する効果は、含まれるタンパク質やそれが分解して生ずるアミノ酸の効果だけによるものではなく、NRSの中に含まれる未同定の物質や、それとタンパクとの複合効果によるものと考えられる。

以下実施例をもって、本発明を説明する。

#### 実施例の1

グルコース10g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  34mg、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  77mg、KCl 10mg に、NRSのプロテアーゼ分解液（NRS 20gをH/30リン酸バッファーpH7.0 1ℓに添加し、不溶性物質はそのままにして、これにプロナーゼ200mgを添加し、30℃ 12hr 反応させたもの。タンパク質の分解率は約94 %である）をNRS換算で2 g 相当量を添加し、pHを7.0 に調整したのち、純水で1 ℓに希釈する。

一方、グルコース10g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  34mg、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  77mg、KCl 10mg に、酵母

#### 特開平1-157395(2)

であるが、この内、有機Nのバランスをみると、不溶性窒素化合物が 0 %、不溶性無窒素化合物が 1.5 %、可溶性有機窒素化合物が 16.5 %、可溶性無窒素化合物が 28 % その他、硫酸アンモニウム 28 %、灰分 18 %、水分 2 % となっている。可溶性無窒素化合物 28 % 中発酵原料となりそうな有機酸や還元糖の含量は小量であり、NRSは発酵のC源とはなりにくいと考えられるが、単純な有機窒素源であるとも言えない。

実験結果によれば、NRSは、その形態が液体であれ、粉末であれ、細菌、酵母において広く生育促進効果を示し、培地有機窒素源に酵母エキス、HVP、CSL等を用いる発酵ではこれらをNRSに置き換えて十分発酵生産の目的を達することが明らかとなった。また、その効果は、細菌の場合は、好気性菌でも、嫌気性菌でも同様であった。さらに、一部の微生物では、NRSを培地に添加する前に、予めプロテアーゼ処理によって加水分解しておいても、加水分解せずにそのまま培地に添加しても同様の効果が見られた。

エキス（オリエンタル酵母社製）5 g とポリペプトン（大五栄養製）5 g を加えpH調整後純水によって1 ℓとしたものを対照とした。

これら両培地に、TGC液体培地に 30℃ で一夜培養した *Streptococcus lactis* (ATCC 19435) を20ml接種し、30℃ で静置培養した。培養 12 時間後の菌体濁を乾燥菌体重量法により、生成した乳酸量をHPLCによって定着した。NRSを含む培地においては、乾燥菌体重1.28g/ℓ、乳酸生成量 9.2g/ℓであった。一方、酵母エキス、ポリペプトンを含む対照培地では、乾燥菌体重量 1.25g/ℓ、乳酸生成量 9.0g/ℓ が得られた。

#### 実施例2

キャッサバ澱粉の酵素糖化液（キャッサバ澱粉100gを500mlの純水に溶解の後、 $\alpha$ -アミラーゼ600mgを添加して70℃に加温して30分間保持し、液化を行う。しかるのち、40℃に冷却し、グルコアミラーゼを添加して、ゆっくり振とうしながら24時間反応させた糖化液をグルコース10g 相当量

### 特開平1-157395(3)

計算し、これに酵母エキス0.3g、ペプトン0.5gを添加し、pH 6.2に調整の後純粋で100mlに希釈したものを基準培地とした。

一方、キャッサバ澱粉の酵素糖化液をグルコース10g相当量計算し、これにNRS粉末(プロテアーゼ処理しないもの)0.3gとペプトン0.5gを添加し、pH6.2に調整の後、純水で100mlに希釈したものを検討培地とした。

また、キャッサバ澱粉の酵素糖化液をグルコース10g相当量計算し、ペプトン0.5gを添加し、pH 6.2に調整の後純水で100mlに希釈したもの、および、キャッサバ澱粉の酵素糖化液をグルコース10g相当量計算し、あとは何も加えない培地を比較培地とした。

これら4種類の培地をmeisselに入れて殺菌し、YM(Difco)液体培地で30℃、2日培養した *Zyomonas mobilis* NRRL B14023 を5ml接種後2日培養し、乾燥菌体重量と生成したエタノールを測定した。

糖液に酵母エキス、ペプトンを加えた培地では、

乾燥菌体重量2.05mg/mlとエタノール5.22mlがえられ、NRSを用いた培地では、菌体重量1.61mg/mlとエタノール5.01mlがえられた。一方、糖液にペプトンだけ加えた培地では、菌体重量0.84mg/mlとエタノール3.85mlがえられたが、糖液だけの培地では菌の生育、エタノールの生成共全く認められなかった。

#### 実施例の3

実施例の2で用いたと全く同じ糖液を、グルコース10g相当量計算し、これに酵母エキス0.3g、マルトエキス0.3g、ペプトン0.5gを添加し、pH6.2に調整の後純水で100mlに希釈したものを基準培地とした。

一方、糖液をグルコース10g相当量計算し、これにNRS粉末(プロテアーゼ処理しないもの)0.3gとペプトン0.5gを添加し、pH6.2に調整の後、純水で100mlに希釈したものを検討培地とした。

また、糖液をグルコース10g相当量計算し、ペプトン0.5gを添加し、pH6.2に調整の後純水で10

0mlに希釈したもの、および、糖液をグルコース10g相当量計算し、あとは何も加えない培地を比較培地とした。

これら4種類の培地をmeisselに入れて殺菌し、グルコース10g/l、酵母エキス3g/l、マルトエキス3g/l、ペプトン5g/l(pH6.2)からなる前培養培地で30℃、2日培養した *Saccharomyces uvarum* IF0 0565 を5ml接種後2日培養し、乾燥菌体重量と生成したエタノールを測定した。

糖液に酵母エキス、マルトエキス、ペプトンを加えた培地では、乾燥菌体重量4.90mg/mlとエタノール4.89mlが得られ、NRSを用いた培地では、菌体重量4.04mg/mlとエタノール4.58mlがえられた。一方、糖液にペプトンだけを加えた培地では、菌体重量0.64mg/mlとエタノール1.99mlがえられた。また、糖液だけの培地でも菌体重量0.33mg/mlとエタノール0.84mlがえられた。

#### 実施例の4

グルコース 1.0 % 、ヘキサメタリン酸ソーダ

0.17 % 、KCl 0.1 % 、  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.04 % からなる培地(pH 7.0)を基本とし、

① 他にはなにも加えないもの

② 脱脂大豆塩酸加水分解物(HVP)を

0.5ml/dlの濃度なるよう添加したもの

③ 酵母エキス 0.25 % を添加したもの

④ NRS粉末 0.25 % を添加したもの

の4種の培地を作成し、これを500ml瓶とうフラスコに20mlずつ分注し殺菌の後、グルコース 1.0 %、酵母エキス 1.0 %、ポリペプトン 1.0 %、NaCl 0.5 %からなる前培養培地(pH 7.0)に *Pseudomonas aeruginosa* KYU-1(FERH P 0701) を接種し、30℃一夜振とう培養したアロスを100μl添加して、30℃で3日間振とう培養を行い、生成した乾燥菌体重量を測定した。培地①では、菌の生育は全く認められなかった。培地②では乾燥菌体重量は2.3mg/mlに、培地③では乾燥菌体重量は2.9mg/mlに、培地④では乾燥菌体重量は3.1mg/mlは、それぞれ違った。

特開平1-157395(4)

#### 実施例の5

グルコース 10 %、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 %、 $\text{H}_2\text{SO}_4$ ・ $7\text{H}_2\text{O}$  0.24 %、 $\text{FeSO}_4$ ・ $7\text{H}_2\text{O}$  0.01 %、 $\text{H}_2\text{SO}_4$ ・ $4\text{H}_2\text{O}$  0.001 %、ビタミン  $\text{B}_1$  100r/l、ビオチン 3r/l からなる培地に、液状 NRS を 1.0ml/dl の濃度で添加し、pH を 7.0 に調整の後殺菌し、全容 1 l のミニジャーフェーマンターに 300ml を張り込んだ。

一方 NRS 以外は全く同じ組成の培地に、NRS の替わりに、実施例の4で用いた脱脂大豆塩酸加水分解物を 0.75ml/dl の濃度なるよう添加したのを、先と同様 pH を 7.0 に調整の後殺菌し、全容 1 l のミニジャーフェーマンターに 300ml を張り込み対照とした。この両ジャーに、グルコース

1.0 %、酵母エキス 1.0 %、ポリペプトン 1.0 %、 $\text{NaCl}$  0.5 % からなる前培養培地 (pH 7.0) に

Brevibacterium flavum ATCC 14067 を接種し、30℃ 一夜振とう培養したブ罗斯を 15ml 添加して、温度 34℃、通気量は 1/2 VVM、1200rpm、pH 制御はアモニア水をフィードしながら pH を 7.5 に制

御する方法で培養した。30時間培養の後、脱脂大豆塩酸加水分解物を用いた培養液には対糖 46.5% のグルタミン酸が蓄積し、液状 NRS を用いた培養液には対糖 48.2 % のグルタミン酸が蓄積していた。

特許出願人  
代理人

サントール 株式会社  
松尾 憲一郎

#### 手続補正書 (方式)

昭和63年3月19日

特許庁長官 小川 邦夫 殿

1. 事件の表示  
昭和62年 特許願 第313444号

2. 発明の名称  
微生物の培養法

3. 補正をする者  
事件との関係 特許出願人  
氏名 サントール 株式会社

4. 代理人  
住所 〒810 福岡市中央区今泉2丁目4番26号  
今泉コーポラス1階 ☎ 092-714-0090  
氏名 (8016) 弁理士 松尾 憲一郎

5. 補正命令の日付  
昭和63年2月3日

6. 補正の対象  
代理権を証明する書面及び明細書

7. 補正の内容  
①別紙の通り委任状を提出します。  
②浄書した明細書を別紙の通り提出します。

#### 手続補正書 (自発)

平成 1年 2月17日

特許庁長官 吉田 文毅 殿

1. 事件の表示  
昭和62年 特許願 第313444号

2. 発明の名称  
微生物の培養法

3. 補正をする者  
事件との関係 特許出願人  
氏名 サントール 株式会社

4. 代理人  
住所 〒810 福岡市中央区今泉2丁目4番26号  
今泉コーポラス1階 ☎ 092-714-0090  
氏名 (8016) 弁理士 松尾 憲一郎

5. 補正の対象  
明細書

6. 補正の内容  
別紙の通り明細書全文を補正します。

## 明 細 書

### 1. 発明の名称

#### 微生物の培養法

### 2. 特許請求の範囲

- 1) 天然ゴムの樹液からラテックスを分離した残りの母液を濃縮し、もしくはスプレードライ法によって粉末化して、それをそのまま発酵培地とし、または発酵培地に一部添加して、その培地に細菌（放線菌を含む）、真菌（酵母または糸状菌）を接種して増殖させ、菌体を生産させ、及び／または特定の発酵生産物を蓄積させる微生物の培養法。

### 3. 発明の詳細な説明

#### 〔産業上の利用分野〕

本発明は微生物の培養法に関する。

一般に、微生物はその生育に色々な栄養因子を要求することが多く、それらは、アミノ酸、ビタミン、ミネラルなど多様であり、また、必ずしも一つだけでなく、複数の栄養因子を要求することも多い。従って、発酵用の培地には、複数の栄養因子を供給する目的で、有機窒素源などの天然の有機栄養が用いられる。これらには、脱脂大豆加水分解液(HVP)、Corn Steep Liquor(CSL)、綿実ミール、ピーナツミール、pharmamedia、distillers soluble、家畜血液、屠殺廃液、カゼイン水解物など多種多様である。しかも、これらを工業生産の発酵原料とする場合には、コストが安価なこと、季節的、突発的ではなく安定的に供給できること、品質が安定していることなどが必須である上に、色々な微生物に広く効果のある、普遍的なものであることが望ましい。このような条件を満足するのは、上記の多数の天然有機栄養源のなかでも、HVP、CSL、酵母エキスなどに限られるが、HVPやCSLはそれぞれ食品工業の副産物として製造されている為に、最近では製法の

特開平1-157395(5)

#### 〔従来の技術とその解決すべき課題〕

天然ゴムの樹液からラテックスを分離した残りの母液（以下Natural Rubber Serum 略してNRSと呼ぶ）は、いわば天然ゴム生産における産業廃棄物であり、天然ゴム生産園におけるこの放置は環境保全上看過できなくなりつつある。まして、NRSは、多量のタンパク質を含み、有機酸、糖類、及びその誘導体をふくんでいるので、微生物にとっては富栄養価をもつものと考えられ、放置すれば、大きな環境汚染を引き起こすことになりかねないが、反面、資源化できれば新しい大きなバイオマスとなりうる可能性もひめている。

#### 〔課題を解決するための手段〕

本発明者は、東南アジアのラテックス工場で排出するNRSを原料としてこれを濃縮し、あるいは粉末のNRSとしたものを用いて実験し、このような液状あるいは粉末のNRSには色々な微生物に対する生育促進効果や、生育必須因子を含んでいることを見いだした。

転換とともにコスト高になったり、供給量が減少しており、酵母エキスはコスト高で工業原料としては難点が多い。

粉末NRSの一般的性状は、元素分析値では

C	22 %
H	5.5 %
N	9.5 %
Ash	18.5 %

であるが、この内、有機Nのバランスをみると、不溶性窒素化合物が6%、不溶性無窒素化合物が1.5%、可溶性有機窒素化合物が16.5%、可溶性無窒素化合物が28%その他、硫酸アンモニウム28%、灰分18%、水分2%となっている。可溶性無窒素化合物28%中発酵原料となりそうな有機酸や還元糖の含量は少量であり、NRSは発酵のC源とはなりにくいと考られるが、単純な有機窒素源であるとも言えない。

実験結果によれば、NRSは、その形態が液体であれ、粉末であれ、細菌、酵母において広く生育促進効果を示し、培地有機窒素源に酵母エキス、

HVP、CSL等を用いる発酵ではこれらをNRSに置き換えて十分発酵生産の目的を達することが明らかとなった。また、その効果は、細菌の場合は、好気性菌でも、嫌気性菌でも同様であった。さらに、一部の微生物では、NRSを培地に添加する前に、予めプロテアーゼ処理によって加水分解しておいても、加水分解せずにそのまま培地に添加しても同様の効果が見られた。

このような実験事実を考えると、NRSの微生物に対する効果は、含まれるタンパク質やそれが分解して生ずるアミノ酸の効果だけによるものではなく、NRSの中に含まれる未同定の物質や、それとタンパクとの複合効果によるものと考えられる。

#### (実施例)

以下実施例をもって、本発明を説明する。

#### (第1実施例)

グルコース10g、 $\text{HgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  34mg、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  77mg、 $\text{KCl}$  10mg に、

を含む対照培地では、乾燥菌体重量 1.25g/l、乳酸生成量 9.0g/l が得られた。

#### (第2実施例)

キャッサバ澱粉の酵素糖化液(キャッサバ澱粉100gを500mlの純水に溶解の後、 $\alpha$ -アミラーゼ600mgを添加して70℃に加温して30分間保持し、液化を行う。しかるのち、40℃に冷却し、グルコアミラーゼを添加して、ゆっくり振とうしながら24時間反応させた糖化液をグルコース10g相当量計算し、これに酵母エキス0.3g、ペプトン0.5gを添加し、pH 6.2に調整の後純粋で100mlに希釈したものを基準培地とした。

一方、キャッサバ澱粉の酵素糖化液をグルコース10g相当量計算し、これにNRS粉末(プロテアーゼ処理しないもの)0.3gとペプトン0.5gを添加し、pH 6.2に調整の後、純水で100mlに希釈したものを検討培地とした。

また、キャッサバ澱粉の酵素糖化液をグルコース10g相当量計算し、ペプトン0.5gを添加し、pH

$\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  77mg、 $\text{KCl}$  10mg に、NRSのプロテアーゼ分解液(NRS 20gをH/30リン酸バッファーpH7.0 1lに添加し、不溶性物質はそのままにして、これにプロナーゼ200mgを添加し、30℃ 12hr 反応させたもの。タンパク質の分解率は約94%である)をNRS換算で2g相当量を添加し、pHを7.0に調整したのち、純水で1lに希釈する。

一方、グルコース10g、 $\text{HgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  34mg、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  77mg、 $\text{KCl}$  10mg に、酵母エキス(オリエンタル酵母社製)5gとポリペプトン(大五栄製)5gを加えpH調整後純水によって1lとしたものを対照とした。

これら両培地に、TGC液体培地に30℃で一晩培養した *Streptococcus lactis*(ATCC 19435)を20ml接種し、30℃で静置培養した。培養12時間後の菌体量を乾燥菌体重量法により、生成した乳酸量をHPLCによって定着した。NRSを含む培地においては、乾燥菌体重量1.28g/l、乳酸生成量 9.2g/lであった。一方、酵母エキス、ポリペプトン

6.2に調整の後純水で100mlに希釈したもの、および、キャッサバ澱粉の酵素糖化液をグルコース10g相当量計算し、あとは何も加えない培地を比較培地とした。

これら4種類の培地をmeisselに入れて殺菌し、YM(Difco)液体培地で30℃、2日培養した *Zymomonas mobilis* NRRL B14023を5ml接種後2日培養し、乾燥菌体重量と生成したエタノールを測定した。

糖液に酵母エキス、ペプトンを加えた培地では、乾燥菌体重量2.05mg/mlとエタノール5.22mlがえられ、NRSを用いた培地では、菌体重量1.61mg/mlとエタノール5.01mlがえられた。一方、糖液にペプトンだけ加えた培地では、菌体重量0.84mg/mlとエタノール3.85mlがえられたが、糖液だけの培地では菌の生育、エタノールの生成共全く認められなかった。

#### (第3実施例)

第2実施例で用いたと全く同じ糖液を、グルコ

ース10g 相当量計量し、これに酵母エキス0.3g、マルトエキス0.3g、ペプトン0.5gを添加し、pH6.2 に調整の後純水で100ml に希釈したものを基準培地とした。

一方、糖液をグルコース10g 相当量計量し、これにNRS粉末(プロテアーゼ処理しないもの)0.3gとペプトン0.5gを添加し、pH6.2 に調整の後、純水で100ml に希釈したものを検討培地とした。

また、糖液をグルコース10g 相当量計量し、ペプトン0.5gを添加し、pH6.2 に調整の後純水で100ml に希釈したもの、および、糖液をグルコース10g 相当量計量し、あとは何も加えない培地を比較培地とした。

これら4種類の培地をneisselに入れて殺菌し、グルコース10g/l 酵母エキス3g/l、マルトエキス3g/l、ペプトン5g/l(pH6.2) からなる前培養地で30℃、2日培養した*Saccharomyces uvarum* IFO 0565を5ml 接種後2日培養し、乾燥菌体重量と生成したエタノールを測定した。

糖液に酵母エキス、マルトエキス、ペプトンを

NaCl 0.5 %からなる前培養培地(pH 7.0)に*Pseudomonas aeruginosa* KYU-1(FERM P 0701)を接種し、30℃一夜振とう培養したブrossを100  $\mu$ l 添加して、30℃で3日間振とう培養を行い、生成した乾燥菌体重量を測定した。培地①では、菌の生育は全く認められなかった。培地②では乾燥菌体重量は2.3mg/mlに、培地③では乾燥菌体重量は2.9mg/mlに、培地④では乾燥菌体重量は3.1mg/mlは、それぞれ達した。

#### (第5実施例)

グルコース 10 %、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 %、 $\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.24 %、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 %、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.001 %、ビタミン  $\text{B}_1$  100r/l、ビオチン3r/lからなる培地に、液状NRSを1.0ml/dlの濃度で添加し、pHを7.0 に調整の後殺菌し、全容1lのミニジャーフェーマンターに300mlを張り込んだ。

一方NRS以外は全く同じ組成の培地に、NRSの替わりに、第4実施例で用いた脱脂大豆塩酸

#### 特開平1-157395(7)

加えた培地では、乾燥菌体重量4.90mg/mlとエタノール4.89mlが得られ、NRSを用いた培地では、菌体重量4.04mg/mlとエタノール4.58mlがえられた。一方、糖液にペプトンだけを加えた培地では、菌体重量0.64mg/mlとエタノール1.99mlがえられた。また、糖液だけの培地でも菌体重量0.33mg/mlとエタノール0.84mlがえられた。

#### (第4実施例)

グルコース 1.0 %、ヘキサメタリン酸ソーダ 0.17 %、KCl 0.1 %、 $\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.04 %からなる培地(pH 7.0)を基本とし、

① 他にはなにも加えないもの

② 脱脂大豆塩酸加水分解物(HVP)を0.5ml/dlの濃度なるよう添加したもの

③ 酵母エキス 0.25 %を添加したもの

④ NRS粉末 0.25 %を添加したもの

の4種の培地を作成し、これを500ml瓶とうフラスコに20mlずつ分注し殺菌の後、グルコース 1.0 %、酵母エキス 1.0 %、ポリペプトン 1.0 %、

加水分解物を0.75ml/dlの濃度なるよう添加したものを、先と同様pHを7.0に調整の後殺菌し、全容1lのミニジャーフェーマンターに300mlを張り込み対照とした。この両ジャーに、グルコース 1.0 %、酵母エキス 1.0 %、ポリペプトン 1.0 %、NaCl 0.5 %からなる前培養培地(pH 7.0)に*Brevibacterium flavum* ATCC 14067を接種し、30℃一夜振とう培養したブrossを15ml添加して、温度34℃、通気攪はんは1/2 VVM、1200rpm、pH制御はアモニア水をフィードしながらpHを7.5に制御する方法で培養した。30時間培養の後、脱脂大豆塩酸加水分解物を用いた培養液には対糖46.5%のグルタミン酸が蓄積し、液状NRSを用いた培養液には対糖48.2%のグルタミン酸が蓄積していた。

#### (発明の効果)

1. 東南アジアのラテックス工場等で排出するNRSを培地用原料として用いることができ、NRSの有効利用を図ることができる。

特開平1-157395(8)

またNRSの有効利用によって、環状汚染の必要がない。

2. NRSは色々微生物に対する生育促進効果を含んでいるので、微生物の生育を促進しすることができる。

特許出願人  
代理人

サントール 株式会社  
松 尾 憲 一 郎